

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS
VON MEMBRAN-AKTIVEN SUBSTANZEN
AUF DIE INSULINSEKRETION**

Ludwig Maximilian Mayer

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554612_0044

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR PROFESSOR DR. EBERHARD BUCHBORN

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS

VON MEMBRAN-AKTIVEN SUBSTANZEN

AUF DIE INSULINSEKRETION

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN

AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

LUDWIG MAXIMILIAN MAYER

aus

Sonthofen

1976

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft SFB 51

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.R.Landgraf

Mitberichterstatter: Prof.Dr.P.C.Scriba

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.1976



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinen Eltern gewidmet

Zuerst möchte ich Herrn Prof.Dr.med.P.C.Scriba für die Überlassung des Themas zur vorliegenden Arbeit danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.Doziert.med. R. Landgraf und Frau Dr.med. M.M.C. Landgraf-Leurs, die mich in die wissenschaftliche Arbeit einwiesen und bei deren Fortgang tatkräftig unterstützten.

Ebenfalls herzlicher Dank gebührt der medizinisch-technischen Assistentin Fräulein R. Hörl für die stetige Hilfsbereitschaft bei praktischen Problemen im Labor.

Herrn L. Bestler danke ich für die Durchführung der technischen Zeichnungen, Fräulein F. Haag für die photographischen Arbeiten, und Frau M. Preisendanz für die Reinschrift dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. METHODEN</u>	6
2.1. Material	6
2.2. Pankreaspräparation	6
2.3. Perfusionskammer	8
2.4. Perfusionslösung	10
2.5. Experimentelles Design	10
2.6. Insulin-Radioimmuno-Assay	11
<u>3. ERGEBNISSE</u>	15
3.1. Effekt von Ethacrynsäure (EA) auf die Insulinsekretion	15
3.2. Wirkung von Ethacrynsäure auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion	19
3.3. Effekt von Dithiothreitol (DTT) auf die Insulinsekretion	23
3.4. Effekt von Dithiothreitol auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion	24
3.5. Zusammenwirken von Dithiothreitol und Ethacrynsäure auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion	26
<u>4. DISKUSSION</u>	28
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	33
<u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u>	34

1.

EINLEITUNG

Das Krankheitsbild des Diabetes mellitus ist seit langem bekannt. Wichtige Stationen auf dem Weg zu einem ursächlichen Verständnis dieser schweren Stoffwechselstörung waren die Versuche von MEHRING und MINKOWSKI (1), die Hunde pankreatektomierten und damit das Bild eines Diabetes mellitus erzeugen konnten. Bald darauf entdeckte man, daß die von Langerhans gefundenen Inseln des Pankreas (2) ein Hormon produzierten, das den Blutzucker senkt (3). Die Isolierung des Hormons gelang allerdings erst 1922 BANTING und BEST (4). Die Schwierigkeiten bestehen im geringen Anteil der Inseln von ca. 1% an der Gesamtmasse des Pankreas, sowie der Zerstörung von Inseln durch Proteasen des exogenen Pankreasgewebes.

DUNN, SHEEHAN und McLEITCHIE konnten 1943 im Tierexperiment durch selektive Schädigung der Beta-Zellen des Pankreas mit Alloxan (5) einen Diabetes mellitus erzeugen. Damit rückte die Beta-Zelle in den Mittelpunkt der Insulin- und Diabetes-Forschung.

Obwohl man weiß, daß der Diabetes mellitus durch eine relative oder absolute Hypoinsulinämie bedingt ist, sind die genaueren Ursachen dieser Störung nicht bekannt. Ebensowenig ist der physiologische Mechanismus der Insulinsekretion geklärt. Die genaue Kenntnis über Funktionen und Arbeitsweise der normalen Beta-Zelle würde aber zur Aufklärung der Pathogenese des Diabetes mellitus wesentlich beitragen.

Eine entscheidende Frage in der Insulinforschung ist, wie die Beta-Zelle des Pankreas Glukose und andere stimulierenden Substanzen erkennt, und wie ein solcher Stimulus in dieser Zelle transformiert wird, so daß adäquate Mengen Insulin freigesetzt werden.

Als Antwort auf das Problem der Stimuluserkennung haben sich zwei Theorien entwickelt: 1. Die sogenannte Stoffwechseltheorie besagt, daß ein Stimulus, z.B. Glukose, zuerst in der Beta-Zelle metabolisiert werden muß, bevor Insulin freigesetzt

werden kann. 2. Bei der sogenannten Rezeptortheorie wird angenommen, daß die Bindung der stimulierenden Substanz an einen Rezeptor in oder an der Beta-Zelle den Insulin-Sekretionsmechanismus in Gang bringt.

Der ersten Theorie liegen Untersuchungen von GRODSKY et al. (6) zugrunde, wonach nur metabolisierbare Zucker wie Glukose, Mannose und Fruktose Insulin freisetzen. COORE und RANDLE konnten zeigen (7, 8), daß Mannoheptulose durch Inaktivierung von Glukose-6-Phosphotransferasen die Glukose-induzierte Insulinsekretion hemmt. Phlorizin dagegen läßt trotz der Blockierung des Glukosetransports in die Beta-Zelle die Insulinsekretion unbeeinflußt (9). Ebenfalls für die Stoffwechseltheorie sprechen Befunde von ASHCROFT et al. (10) und MATSCHINSKY et al. (11), die parallel zur Glukose-induzierten Insulinsekretion einen Anstieg der Laktatkonzentration und weiterer Metaboliten des Glukosestoffwechsels fanden. Auch der Anstieg von Glukose-6-Phosphat und Fruktose-1,6-Diphosphat vor meßbarer Insulinsekretion auf Glukosereiz (12), sowie Befunde von MALAISSE und RAVAZZOLA (13) über die mögliche Bedeutung von Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und 3-Phosphoglyceratkinase für die Insulinfreisetzung weisen in die gleiche Richtung.

Dem gegenüber stehen Untersuchungen von LANDGRAF et al. (14) am perfundierten Rattenpankreas, bei denen ein nicht metabolisierbarer Zucker (Galaktose) Insulin freisetzen kann. Glukosamin, das in der Beta-Zelle verstoffwechselt wird, setzt kein Insulin frei (16). LÖFFLER et al. (15) konnten zeigen, daß bei fast vollständiger Blockierung der Glukoseoxidation durch Natriumfluorid oder Jodacetat die Glukose-induzierte Insulinsekretion nur um 40% abnahm.

MATSCHINSKY et al. (17, 18) stellten fest, daß während der ersten 5 Minuten einer Glukose-stimulierten Insulinsekretion die Konzentration von Schlüssel-Metaboliten der Glykolyse unverändert waren und erst nach einer Stunde deutlich anstiegen. PACE et al. (19) machten in kürzlich unternommenen Versuchen mit verschiedenen Aminosäuren, Jodacetat und niedrigen Glukose-

konzentrationen die Doppelfunktion von Glukose als Energielieferant und als Stimulus für die Insulinfreisetzung erneut deutlich. Weiter erhärtet wird die Rezeptortheorie der Insulinsekretion durch Experimente mit Neuraminidase, einem Enzym, das die N-acetyl-neuraminsäure an der Zellmembranoberfläche inaktiviert und damit die Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung fast vollständig hemmt, ohne die Empfindlichkeit der Beta-Zelle für andere Stimuli der Insulinsekretion zu beeinflussen (20).

Ein wesentlicher Verknüpfungspunkt beider Hypothesen sind Untersuchungen über die Rolle von monovalenten und divalenten Kationen für die Stimuluserkennung und Sekretionsauslösung.

Nach MILNER und HALES reguliert eine Natrium-Kalium-Pumpe die intrazelluläre Konzentration von Natrium und Kalium, wobei deren Änderung die Hormonausschüttung modifiziert (21 - 23). Wie alle sekretorischen Prozesse erfordert auch die Insulinfreisetzung Calcium-Ionen (23). In Calcium-freiem Medium erfolgt auf Glukose-Stimulation keine Insulinsekretion (24, 25). Steigende Calcium-Konzentrationen können die Insulinausschüttung verstärken (26, 27), wobei der entscheidende Vorgang die durch Glukose stimulierte Calcium-Aufnahme in die Beta-Zelle zu sein scheint (28, 29). WOLLHEIM et al. (30) konnten mit Ionophoren, Antibiotika mit Carboxylsäure-Anteil, die Calcium ins Zellinnere transportieren, auch ohne Glukose eine anhaltende Insulinsekretion erzeugen. Für die Insulinsekretion ist jedoch nicht nur die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bedeutend, sondern wie MALAISSE et al. (31, 32) zeigen konnten, auch die intrazelluläre Umverteilung von Calcium (Kompartimentierung) von einem granulären in einen zytosolischen Pool. In diesem Zusammenhang ist die Hypothese interessant, daß durch erhöhte Calcium-Konzentrationen das mikrotubulär-mikrofilamentöse System aktiviert wird und auf diese Weise die Ausstoßung (Emiozytose) von Sekretgranula gefördert wird (33 - 36). Eng verknüpft mit dem transmembranösen Ionenfluß ist die Depolarisierung und elektrische Aktivität der Zellmembran. Stimulierende Substanzen wie

Glukose, Tolbutamid, einige Metaboliten der Glykolyse und Aminosäuren erzeugen Aktionspotentiale, die in ihrem Ausmaß mit der Höhe der Insulinsekretion korrelieren und in ihrem Muster für die einzelnen Stimuli spezifisch sind (37 - 40).

Ein weiterer wichtiger Verknüpfungspunkt zwischen Inselzellstoffwechsel, den spezifischen hypothetischen Membranrezeptoren und dem oben erwähnten Ionenfluß ist zyklisches 3'5'-AMP (41, 42). Substanzen wie Glukagon und Cortikotropin, die die Adenylzyklase stimulieren (43 - 46) oder solche, die die Phosphodiesterase hemmen wie Coffein, Theophyllin und Parachloromercuribenzoat (44 - 48), erhöhen die Konzentration an zyklischem AMP und steigern gleichzeitig die Insulinsekretion. Über dieses System ist auch eine Rückkoppelung vorstellbar: Insulin senkt die Konzentration an zyklischem AMP und inhibiert damit wirksam die Insulinsekretion (49).

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Befunde von ZAWALICH et al. (50), die bei der Glukose-induzierten Insulinsekretion ein ähnliches biphasisches Muster der zykl. AMP-Konzentration fanden, das zeitlich mit den zwei Phasen des bekannten Insulinsekretionsmusters auf Glukosestimulation korreliert.

Aus den bisher diskutierten Daten wird klar, daß der Beta-Zellmembran eine wichtige Kontrollfunktion nicht nur für die Ausschleusung von Insulin-Sekretgranula, sondern auch für die Stimuluserkennung und eventuell Stimulustransformation zu einem Sekretionsreiz spielen muß. Die experimentelle Diabetologie hat sich deshalb in den letzten Jahren besonders auf die Funktionen und die Möglichkeiten der Beeinflussung der Beta-Zellmembran konzentriert. Die elektronenoptischen Arbeiten von ORCI und Mitarbeitern (51) erbrachten näheren Einblick in die Morphologie der Beta-Zelle und der Zellmembran. Diese Kenntnisse gestatteten Untersuchungen, die darauf abzielten, spezifische Modifikationen der Beta-Zellmembran vorzunehmen. Enzyme wie z.B. Pronase (52, 53), Alpha-Neuraminidase (54, 55), Glukosidasen (56), Phospholipasen (57) und Lektine (58) bedingen eine Konformationsänderung bzw. eine Änderung der biochemischen

Zusammensetzung der Plasmamembran, die von einer Änderung der Ansprechbarkeit der Beta-Zelle auf verschiedene Stimuli begleitet ist.

Arbeiten von HELLMAN et al. (59 - 63) über die mögliche Rolle membrangebundener Sulfhydrylgruppen für das Erkennen von Glukose und anderer Stimuli durch die Beta-Zelle und Untersuchungen von NEEDLEMAN et al. (64, 65), die zeigen, daß organische Nitrat-"Rezeptoren" an glatter Muskulatur durch Sulfhydrylgruppenblockierung in ihrer Sensibilität beeinflußt werden können, führten zu der vorliegenden Arbeit.

Es sollte geklärt werden, ob die Modifikation der Beta-Zellmembran durch Sulfhydryl-reaktive Substanzen, wie Ethacrynsäure als Blocker von SH-Gruppen und Dithiothreitol als starkes SH-reduzierendes Agens, eine Änderung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion bewirkt, und falls eine Änderung der Sekretionskinetik beobachtet wird, ob dieser Effekt für Glukose spezifisch ist. Zur Beantwortung der Frage nach der Spezifität eignete sich die Aminosäure Leucin, die, wie Untersuchungen von LANDGRAF et al. (66, 67) und LERNMARK (68) zeigen, nicht nur ein potenter Stimulator der Insulinsekretion ist, sondern auch eine Sekretionskinetik von Insulin hervorruft, die der von Glukose sehr ähnlich ist.

2. METHODEN

2.1. Material

Dextran von Knoll AG., Ludwigshafen, wurde als konzentrierte Lösung dreimal während mindestens zwei Stunden gegen Aqua bidest. dialysiert, um niedermolekulare Kontaminationen wie z.B. Glukose zu beseitigen. D-Glukose und L-Leucin stammten von der Fa. Merck, Darmstadt. Ethacrynsäure in Form von Natriumethacrynat wurde von der Fa. Merck, Sharp und Dohme, München, und Dithiothreitol (Cleland Reagenz) wurde von Fa. Serva, Heidelberg, bezogen. Hochgereinigtes Rinderalbumin war von den Behringwerken, Marburg. Alle anderen verwendeten Substanzen waren pro analysi der Fa. Merck, Darmstadt.

2.2. Pankreaspräparation

Als Versuchstiere wurden 160 - 350 g schwere männliche Sprague-Dawley Ratten verwendet, die ad libitum mit Altromin^R gefüttert waren. Die Tiere fasteten präoperativ durchschnittlich 18 Stunden. Eine halbe Stunde vor der Narkose bekamen die Tiere 0,2 mg/kg Atropin intraperitoneal gespritzt, um eine durch das Narkosemittel verursachte Bronchialverschleimung zu verhindern. Danach wurden die Ratten mit 45 mg/kg Pentobarbital (Nembutal^R) intraperitoneal anästhesiert. Die folgende Operation nach einer leicht modifizierten Methode von GRODSKY et al. (69) und SUSSMAN et al. (70) diente dazu, das Pankreas zusammen mit Milz, Magen und proximalem Teil des Duodenums zu entfernen.

Zur Freihaltung der Atemwege wurde zu Beginn der Operation tracheotomiert und eine Trachealkanüle gelegt, über die Bronchialschleim leicht abgesaugt werden konnte. - Der Bauchraum wurde mit einem Mittelschnitt vom unteren Abdominalbereich bis zum Processus xiphoideus eröffnet. Danach wurde beidseits ein Schnitt in der Lumbalgegend senkrecht zum Längsschnitt gelegt. Die inneren Organe und der Bauchraum wurden während der Operation mehrfach mit warmer physiologischer Kochsalzlösung getränkt. Das Omentum maius und die versorgenden Gefäße wurden

etwa 5 mm kaudal der großen Kurvatur des Magens unterbunden und so vom angrenzenden Pankreas getrennt und entfernt. Nachdem das Pankreas vom Kolon und distalen Duodenum freipräpariert war, wobei alle intestinalen Gefäße einschließlich der distalen Äste der Art. mesenterica sup. unterbunden und durchtrennt wurden, konnte das gesamte Intestinum vom Rektum bis zum distalen Ende des Duodenums entfernt werden. Zur Sicherung des freien Abflusses des im Gastroduodenalbereich entstehenden Verdauungssaftes wurde das Duodenum mit einem Polyäthylenschlauch kanüliert. Nach der Unterbindung und Durchtrennung des Ösophagus oberhalb des Abgangs der linken Art. gastrica (das Gefäß ist für die Versorgung des Magens wichtig) wurde die Vena portae freipräpariert und der sie begleitende Ductus choledochus zusammen mit der Art. hepatica unterbunden und durchtrennt. Der kraniale Teil des Ductus choledochus wurde mit Operationsfäden und einer Klemme fixiert, um das spätere Einführen der Kanüle in die Vena portae zu erleichtern. Vorhandene Peritonealduplikaturen zwischen Magen und Leber wurden entfernt. Der Magen wurde vorsichtig auf die Seite gelegt und der obere Teil der Aorta abdominalis mit den abgehenden Gefäßen, den A. renales, A. mesenterica sup. und A. coeliaca stumpf freipräpariert. Drei Ligaturen wurden um die Aorta angelegt, oberhalb und unterhalb der Art. coeliaca und distal der Art. mes. sup., eine weitere Ligatur um die Art. coeliaca bei ihrem Abgang aus der Aorta. - Um eine intravasale Gerinnung in den Pankreasgefäßen zu verhindern, wurden 2 - 3 Minuten vor der Unterbindung der Blutzufuhr 100 E Heparin (Liquemin^R) in die Vena cava inf. injiziert. Danach folgte die Unterbindung der Aorta und gegenüber dem Abgang der Art. coeliaca wurde ein kleines Loch in die Aortenwand geschnitten. Durch diese Öffnung wurde ein kleiner Polyäthylenkatheter ca. 2 mm in die Art. coeliaca geschoben und fixiert. Zu dieser Manipulation benötigte man nach der Unterbrechung der Blutzufuhr maximal 2 Minuten, bis der Organkomplex, in situ zunächst, mit oxygenierter und temperierter Perfusionslösung versorgt wurde. - Innerhalb der

nächsten 2 - 3 Minuten wurde die Vena porta so weit kranial wie möglich eröffnet und ebenfalls kanüliert. Schließlich wurde der Organkomplex herausgeschnitten, in die Perfusionskammer gebracht und an die Perfusionslösung angeschlossen. Von der Exzision bis zum Anschluß der Perfusion in der Perfusionskammer vergingen höchstens 3 Minuten. Das nicht rezirkulierende Perfusat wurde in kurzen Intervallen aus der Vena porta-Kanüle aufgefangen. Die Proben wurden bis zur späteren Bestimmung von Insulin bei -20°C tiefgefroren.

2.3. Perfusionskammer

Der prinzipielle Aufbau des Perfusionssystems ist in Abb. 1 dargestellt. Die Perfusionskammer besteht aus einem Plexiglasgehäuse, in dem während des ganzen Experimentes durch einen Thermostaten eine Temperatur von 37°C aufrechterhalten wird. Ebenfalls der Temperaturkonstanz dient eine Umwälzpumpe, die dauernd Wasser von 37°C in den Wärmeblock mit dem darin befindlichen Organkomplex und in die Wassermäntel der Gefäße mit Perfusionslösung bringt. Dadurch herrscht am und im Organkomplex ständig eine gleichbleibende Temperatur. Dies ist wichtig, da die Insulinausschüttung deutlich temperaturabhängig ist (71).

Mittels einer Schlauchpumpe wird die Perfusionslösung vom Vorratsgefäß ins Organ befördert. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug zwischen 4,5 und 5,5 ml/min, und der Perfusionsdruck lag zwischen 30 und 70 mm Hg.

Bei mehreren Perfusionslösungen fließt jeweils nur eine in den Organkomplex, die anderen werden über Dreiweghähne in die entsprechenden Vorratsgefäße zurückgepumpt. - Durch diese Dreiweghähne ist eine rasche Umschaltung von einer Lösung auf eine andere möglich. - Der Totraum zwischen arteriellem Zufluß und venösem Abfluß beträgt ca. 400 μl , wodurch eine vollständige Änderung des Perfusats beim Umschalten von einer Lösung auf eine andere nach spätestens einer Minute erreicht ist.

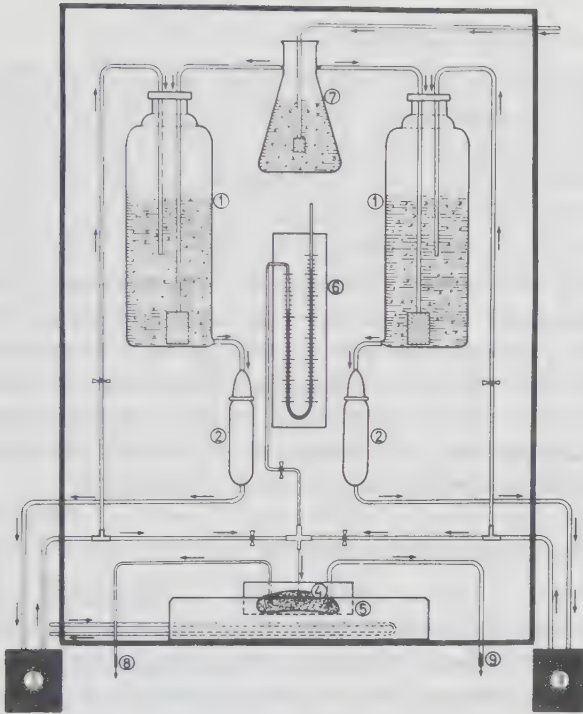


Abb. 1: Schematische Darstellung der Perfusionskammer.

- 1) Perfusionsflüssigkeitsbehälter für Kontroll- und Stimulationsperfusion
- 2) Filter
- 3) Schlauchpumpen
- 4) Organkomplex
- 5) Wärmeblock
- 6) Quecksilbermanometer
- 7) Begasungssystem für $O_2:CO_2$ (95:5 v/v) Gasgemisch
- 8) Vena porta-Kanüle
- 9) Kanüle im Duodenum

Die Behälter (1) und die Schlauchsysteme befinden sich in einer Perfusionskammer, die durch einen Thermostaten auf $37^{\circ}C$ konstant gehalten wird. Außerdem sind die Behälter (1) von Wassermänteln umgeben (nicht dargestellt), die wie der Wärmeblock (5) mit Wasser von $37^{\circ}C$ durchströmt werden. Durch Schlauchklemmen und Dreiweghähne können beide Perfusionslösungen gleichzeitig oder während Kontroll- und Stimulationsperfusion alternierend rezirkulieren.

2.4. Perfusionslösung

Die Perfusionslösung bestand aus einem artefiziellen Medium mit folgender Zusammensetzung: 8% Dextranlösung zur Schaffung eines den physiologischen Verhältnissen vergleichbaren kolloid-osmotischen Drucks, und Krebs-Henseleit-Bicarbonat-puffer mit 120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, und 15 mM NaHCO₃. Diesem Perfusionsmedium wurde einzeln oder in Kombination Glukose, Leucin, Ethacrynsäure oder DTT zugefügt. Die Lösungen wurden anfänglich mit konzentrierter HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt und während des Versuchs mit O₂ : CO₂ (95:5) begast (72). Diese Maßnahme resultierte in einem pH zwischen 7,30 und 7,50, einem Sauerstoffpartialdruck (pO₂) zwischen 280 - 350 mm Hg und einem Kohlensäurepartialdruck (pCO₂) von 28 - 35 mm Hg.

2.5. Experimentelles Design

Vor der Perfusion des Pankreas mit den zu testenden Substanzen wurde 13 Minuten lang mit Kontrollösung perfundiert, um das Organ zu äquilibrieren. Die Kontrollösung enthielt entweder keine oder 3 mM Glukose, eine Konzentration, die selbst keine Insulinsekretion hervorruft. Während der Kontrollphase wurden drei Proben abgenommen, um Werte für die Basalsekretion von Insulin zu messen. Danach wurde auf die Lösung mit der Testsubstanz umgeschaltet. Bei der Umschaltung wurden die Dreiweghähne der Kontroll- und der Testlösung gleichzeitig betätigt, so daß sich der Perfusionsdruck auf das Organ nicht änderte. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß plötzliche Druckänderungen zu Änderungen der Sekretionskinetik führen (73). Die Proben wurden nach dem Umschalten von der Kontrollösung auf die Stimulationslösung bis zur ersten Minute in 15 Sekunden-Abständen, bis zur 5. Minute alle 30 Sekunden und schließlich in 1 - 5-minütigen Abständen abgenommen.

Beim Untersuchen der Eigeneffekte von Ethacrynsäure oder Dithiothreitol in den verschiedenen Konzentrationen auf die Insulinsekretion folgte der 13-minütigen Kontrollphase eine 40-minütige Stimulationsphase mit einer der beiden Substanzen und an-

schließend eine weitere 20-minütige Kontrollperfusion. Das erneute Umschalten auf Kontrolllösung wurde durchgeführt, um die Intaktheit der Langerhans'schen Inseln zu überprüfen. Außerdem hat sich gezeigt, daß bei der Elimination eines Stimulus spezielle Sekretionsphänomene ("off-Effekte") beobachtet werden können, die näheren Aufschluß über den Wirkungsmechanismus einer Substanz geben können (67).

Bei der Untersuchung des Zusammenwirkens von Ethacrynsäure, Dithiothreitol, Glukose oder Leucin auf die Insulinsekretion folgte der Kontrollphase eine 25-minütige Stimulation mit 20 mM Glukose oder Leucin. Darauf wurde während weiterer 25 Minuten mit einer Lösung perfundiert, die 20 mM Glukose oder Leucin und die zu testende Substanz enthielt. Danach erfolgte in 25-minütigen Intervallen zuerst die Eliminierung von Ethacrynsäure oder Dithiothreitol, dann von Glukose oder Leucin. Auch in diesen Sequenzexperimenten wurde zuletzt auf Kontrolllösung umgeschaltet.

Die Proben, jeweils 500 ul, wurden in Eppendorfgefäßen aufgefangen, in denen 20 ul 17,5%iges Rinderalbumin vorpipettiert war. Diese Albuminkonzentration (0,7%) war zur Verhütung einer Wandadsorption von Insulin notwendig.

Nach der Abnahme wurden die Proben gut geschüttelt und danach bis zur Auswertung bei -20°C aufbewahrt.

2.6. Insulin-Radioimmunoassay

Die Bestimmung von Insulin in den Proben erfolgte nach der von HALES und RANDLE beschriebenen Methode (74), wobei der Insulin-Kit der Fa. Amersham Buchler, Braunschweig, verwendet wurde. Als Standard diente Human-Insulin, das in der jeweiligen Perfusionslösung angesetzt wurde. Ratten-Insulin als Standard stand nicht in genügender Menge zur Verfügung. Vergleichende Untersuchungen mit Human- und Ratten-Insulin haben gezeigt, daß der verwendete Insulinantikörper mit beiden Insulinpräparationen gute Kreuzimmunität zeigt, und daß sich die Insulinsekretionsprofile gemessen mit beiden Standards nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Die Sekretionsraten wurden

deshalb in Human-Insulin-Äquivalenten ausgedrückt.

Die Trennung von Antikörper-gebundenem und freiem Insulin erfolgte nach einer semiautomatischen Methode (75) mittels Filtration. Die Radioaktivität wurde im Gamma Guard der Fa. Tracer Lab, Köln, gezählt (Zählheusbeutel für ^{125}Jod war 75%) und die Zählraten in Form von Lochstreifen ausgedruckt. Die Berechnung der Insulinkonzentration aus den Zählraten erfolgte mit Hilfe der Spline-Approximation (76) unter Verwendung des Siemens Computers Typ 404/3.

Wegen großer Unterschiede in der Menge sezernierten Insulins unter den verschiedenen Versuchsbedingungen mußten Eichkurven mit verschiedenen Insulinkonzentrationen und damit unterschiedlichem Empfindlichkeitsbereich verwendet werden (Abb.2). Eine weniger empfindliche Eichkurve ermöglichte das Ablesen von Insulinkonzentrationen zwischen 45 und 500 uU/ml, und eine empfindliche Kurve war für Werte in den unteren Bereichen von 10 bis 120 uU/ml geeignet. Die Insulinwerte im Überschneidungsbereich beider Standardkurven stimmten gut überein.

Die in den Lösungen verwendeten Substanzen wie Glukose, Leucin und Ethacrynsäure hatten keinen Einfluß auf die Insulinbestimmung. Dagegen führte Dithiothreitol zu einer konzentrationsabhängigen Abflachung der Standardkurven (Abb. 3). Dieser Effekt beruht auf der stark reduzierenden Eigenschaft von Dithiothreitol, durch welche wahrscheinlich die Disulfidbrücken des Insulinmoleküls teilweise gesprengt werden, und deswegen die Immunoreaktivität von Insulin verringert wird. Die Proben, die Dithiothreitol enthielten, wurden daher an Standardkurven abgelesen, wobei die Standard-Insulinproben mit korrespondierenden Dithiothreitol-Konzentrationen vorbehandelt wurden.

Da bei vielen Experimenten die Höhe der Insulinfreisetzung nicht vorausgesagt werden konnte, war es notwendig, mehrere Experimente oder einzelne Proben an der Standardkurve mit der geringeren oder mit der höheren Empfindlichkeit nachzumessen.

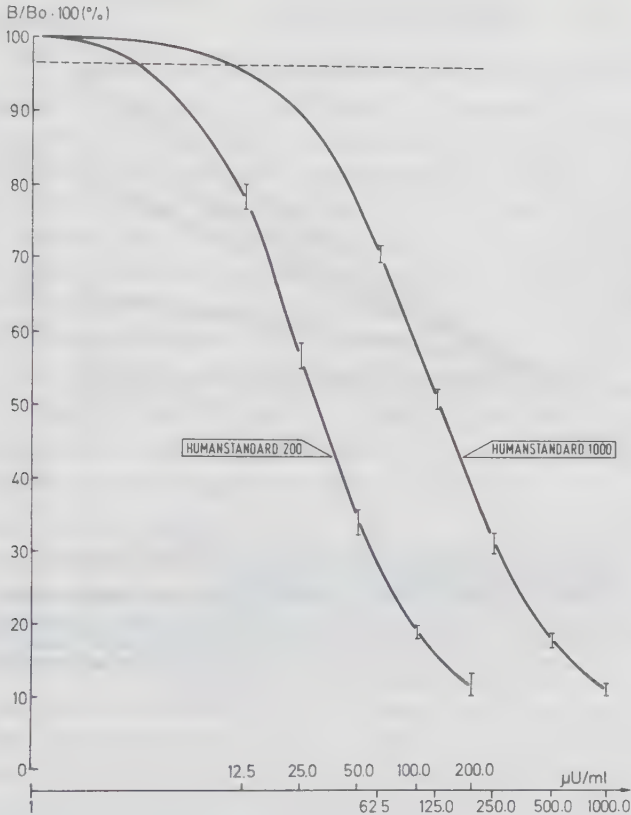


Abb. 2: Standardkurven der radioimmunologischen Insulinbestimmung mit einer empfindlichen (Humanstandard 200) und einer weniger empfindlichen (Humanstandard 1000) Methode ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Aufgetragen ist die B/Bo-Rate (%) des Insulintracers (Ordinate) gegen die Menge zugesetzten Insulins (Abszisse, logarithmisch). Bo ist die Impulsrate des Antikörper-gebundenen ^{125}J -Insulins ohne Zusatz kalten Insulins. B ist die jeweilige Impulsrate des Antikörper-gebundenen Tracers bei verschiedenen Insulin-Standardkonzentrationen. Parallel zur Abszisse ist eine Linie eingetragen, die die untere Nachweisgrenze markiert. Die untere Nachweisgrenze ist als die Insulin-Konzentration definiert, die oberhalb der dreifachen Standardabweichung des Nullstandards (Bo) liegt.

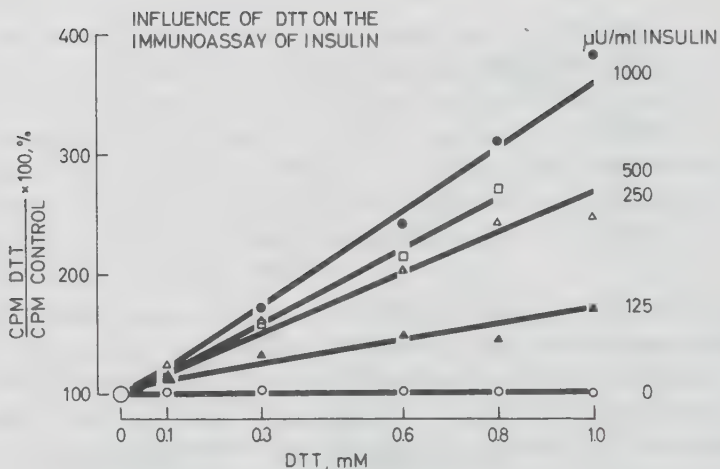


Abb. 3: Einfluß von Dithiothreitol (DTT) auf den Radioimmunoassay von Insulin.
Aufgetragen ist das Verhältnis der Impulsraten pro Minute (CPM) DTT zu Kontrolle des Insulin-Tracers gegen verwendete DTT-Konzentrationen für die verschiedenen Insulin-Standardkonzentrationen 0, 125, 250, 500 und 1000 uU/ml).

In Vorversuchen mußte deshalb geklärt werden, ob mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben einen Insulin-Verlust zur Folge hat. Dazu wurden aus einem gepoolten Perfusat - einer Lösung, die bereits den Organkomplex durchströmt hatte - Proben vor der radioimmunologischen Insulin-Bestimmung ein-, zwei- und dreimal tiefgefroren und wieder aufgetaut, und jeweils für 2 - 4 Stunden bei Zimmertemperatur oder bei 4° C stehengelassen. Keine der Bedingungen führte zu einem meßbaren Insulinverlust in den Proben.

3.

ERGEBNISSE

3.1.

Effekt von Ethacrynsäure auf die Insulinsekretion

Ethacrynsäure (EA), ein spezifisches SH-Reagens, geht mit Sulfhydrylgruppen stabile Alkylverbindungen ein, die mit Substanzen wie Cystein, Glutathion und Mercaptoäthanol nicht reduziert werden können (64, 77). NEEDLEMAN et al. konnten durch Blockierung von SH-Gruppen mit EA die Sensibilität von organischen Nitrat-"Rezeptoren" an der glatten Muskulatur beeinflussen (64, 65). HELLMAN et al. beeinflussten mit SH-reaktiven Substanzen die Insulinsekretion (60, 62).

Die Frage nach dem Einfluß von EA auf die Insulinsekretion hatte auch klinisch-pharmakologisches Interesse, da EA (Hydromedin^R) in der Klinik als Diuretikum angewandt wird und gelegentlich zu Änderungen der Glukohomöostase führen soll (78).

Bei einer EA-Konzentration von 0,015 mM, der niedrigsten EA-Konzentration, die getestet wurde, ließ sich keine signifikante Insulinsekretion messen. Das Sekretionsprofil unterschied sich nicht wesentlich vom Muster einer durch Kontrolllösung erzeugten Basalsekretion.

Wurde nach der Kontrollphase mit einer Lösung perfundiert, die EA in den Konzentrationen 0,075 mM oder 0,12 mM enthielt, so erfolgte ein deutlicher, wenn auch langsamer Anstieg der Insulinsekretion, die über 10 - 15 Minuten anhielt (Abb. 4).

Die höchste angewandte Konzentration von EA 0,6 mM ergab einen auffallend steilen und hohen Anstieg der Insulinsekretion, die allerdings bereits nach 5-6 Minuten wieder auf Basalwerte abfiel (Abb. 5).

Wurden die Integrale der ausgeschütteten Insulin-Mengen während der ersten 10 Minuten der EA-Stimulation berechnet, so konnte eine deutliche Dosiswirkungsbeziehung zwischen EA-Konzentration und sezernierter Insulin-Menge aufgestellt werden (Abb. 6). Die Dosiswirkungskurve zeigt jedoch, daß selbst bei einer Konzentration von 0,6 mM EA noch kein Sekretionsmaximum erreicht ist.

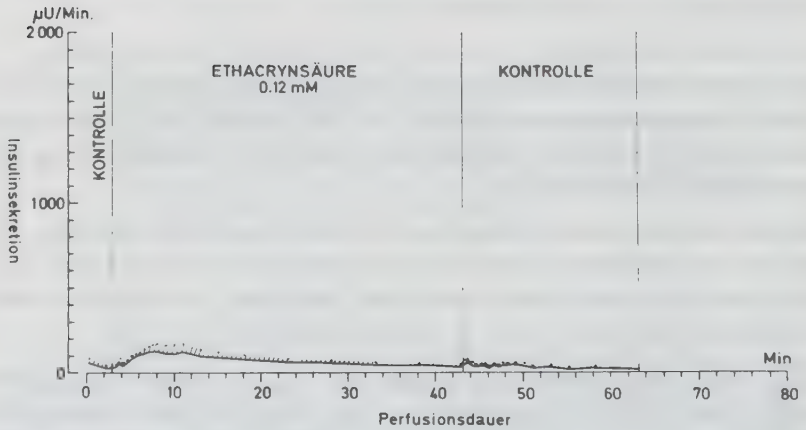
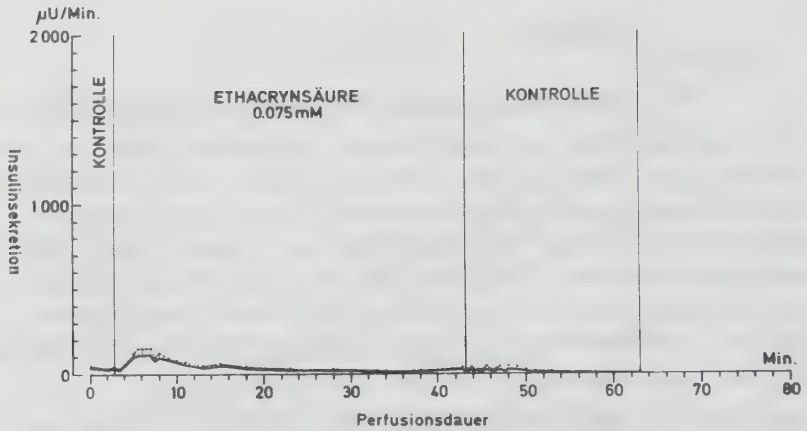


Abb. 4: Ethacrynsäure-induzierte Insulinsekretion.
Perfusion mit einer Ethacrynsäurelösung in den Konzentrationen von 0,075 mM (oben) und 0,12 mM (unten). Das Perfusionsmedium war in allen Experimenten glukosefrei. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von jeweils 3 Perfusionen.

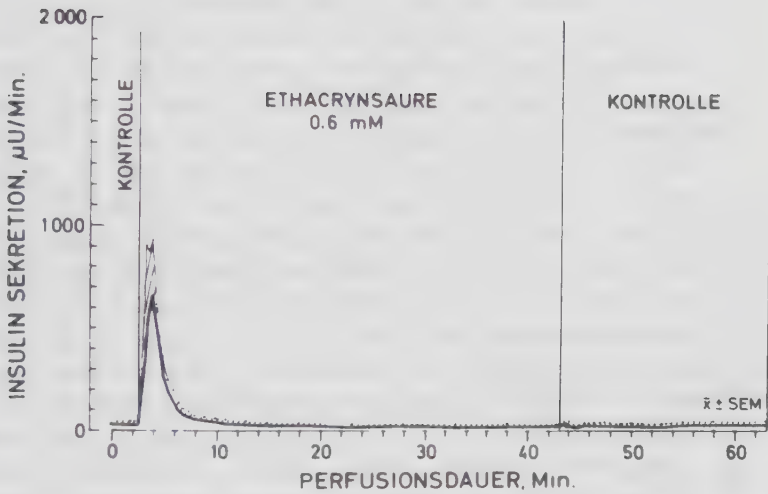


Abb. 5: Ethacrynsäure-induzierte Insulinsekretion.
Perfusion mit einer EA-Lösung in der Konzentration 0,6 mM. Die Perfusionslösung war glukosefrei.
Darstellung der Mittelwertskurve ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) aus 4 Perfusionen.

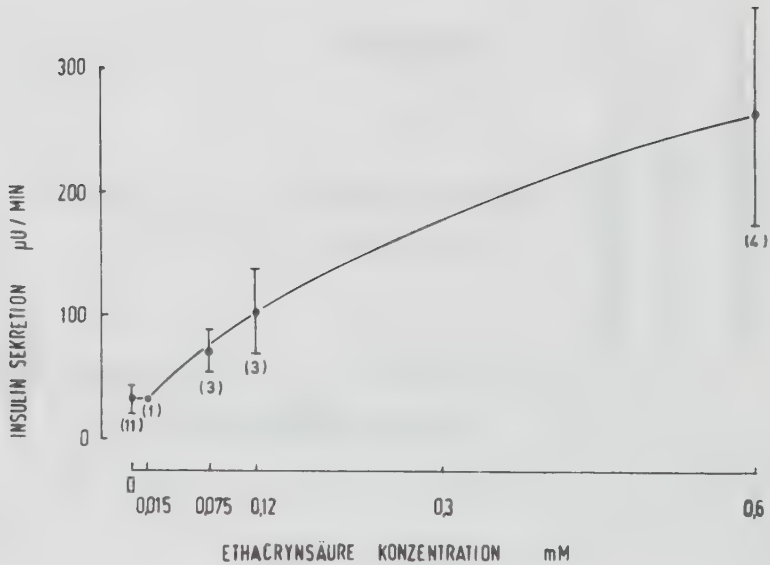


Abb. 6: Dosiswirkungskurve von Ethacrynsäure auf die Insulinsekretion.
Dargestellt sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Zahl der Experimente in Parenthese. Bei der Berechnung der Dosiswirkungsbeziehung wurden die Integrale der Insulinsekretionsraten von 0 - 10 Minuten der Einzelexperimente für jede Konzentration errechnet und anschließend gemittelt und die Sekretionsraten pro Minute kalkuliert.

3.2. Wirkung von Ethacrynsäure auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion

Nachdem EA möglicherweise durch eine Reaktion mit SH-Gruppen an der Beta-Zellmembran eine konzentrationsabhängige Stimulation der Insulinsekretion verursachte, sollte untersucht werden, ob EA die Glukose-induzierte Insulinsekretion modifizieren kann. Diese Versuchsserie umfaßte Experimente mit fünf verschiedenen EA-Konzentrationen. Bei allen Versuchen folgte auf die initiale Kontrollphase mit einer substimulatorischen Glukosekonzentration (3 mM) zunächst eine Stimulation der Beta-Zellen mit 20 mM Glukose während der folgenden 25 Minuten. Die Stimulation mit 20 mM Glukose verursacht ein biphasischer Sekretionsmuster (Abb. 7). Einer raschen Initialphase folgt nach einem vorübergehenden Abfall eine zweite langsam zunehmende Insulinsekretion. Dieses biphasische Muster wurde erstmals von CURRY et al. beschrieben (79). Nach 25 Minuten folgte die simultane Stimulation mit 20 mM Glukose plus EA in verschiedenen Konzentrationen. Daran schloß sich erneut eine Perfusion mit 20 mM Glukose-Lösung an, gefolgt von einer abschließenden Perfusion mit Kontrollmedium.

Bei einer EA-Konzentration von 0,015 mM zeigte sich keine signifikante Änderung der Glukose-induzierten Insulinsekretion (nicht gezeigt).

Bei EA-Konzentrationen von 0,075 mM und 0,12 mM konnte eine geringe langsam zunehmende Inhibierung der Glukose-induzierten Insulinsekretion gemessen werden. Nach Eliminierung von EA trat keine weitere Hemmung der Sekretion auf. Auffallend war jedoch, daß bei der weiteren Perfusion mit 20 mM Glukose die Sekretionsraten nicht mehr den Wert erreichten wie vor der Perfusion mit EA. Somit scheint EA schon bei diesen Konzentrationen zwar nur eine partielle, aber irreversible Hemmung zu verursachen (Abb. 7).

Nach Umschalten von 20 mM Glukose auf eine Lösung mit zusätzlich 0,3 mM EA konnte ein rascher Abfall der Insulinsekretion beobachtet werden, die 20 Minuten nach Perfusionsbeginn mit EA

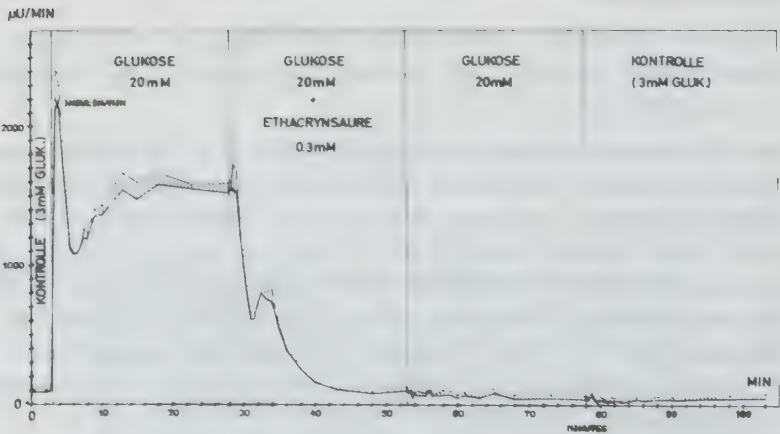
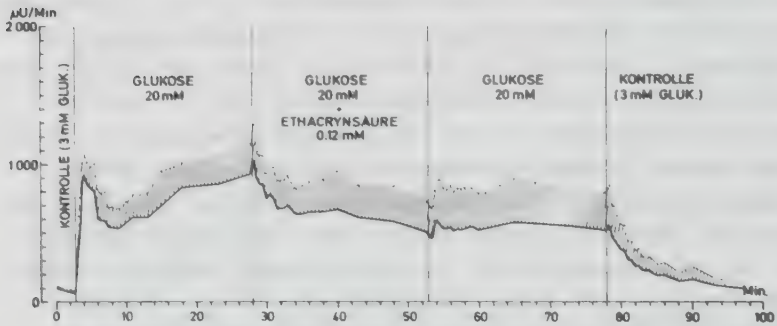
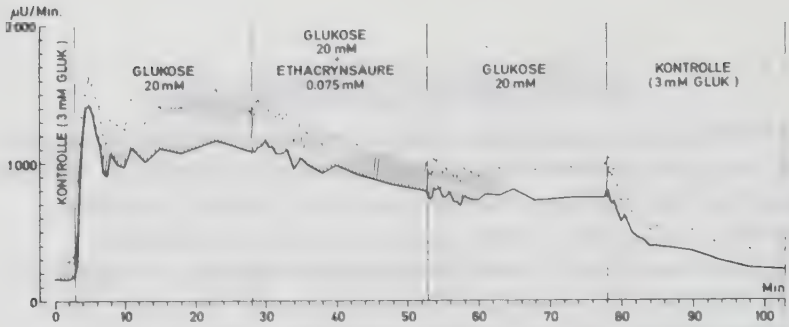


Abb. 7: Wirkung von Ethacrynsäure auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion.

Abzisse : Perfusionsdauer in Minuten

Ordinate : Insulinsekretion in uU/Min.

Dargestellt sind die Mittelwertskurven ($\bar{x}$ + SEM)

aus 4 (0,075 mM EA), 4 (0,12 mM EA) und 3 (0,3 mM EA)

Experimenten.

Basalwerte erreichte. Nach Weglassen von EA war die Glukose-induzierte Hormonsekretion vollständig blockiert (Abb. 7).

Diese Ergebnisse zeigen also eine dosisabhängige Hemmung der Glukose-induzierten Insulinsekretion durch Ethacrynsäure. Im Gegensatz zu den Experimenten mit EA allein (Abb. 4) zeigte sich zu Beginn der Perfusion mit EA bis 0,3 mM während einer submaximalen Glukose-induzierten Insulinsekretion keine initiale Mehrausschüttung von Insulin. Wurde dagegen mit Glukose plus 0,6 mM EA perfundiert, so kam es zu einer passageren Addition der Stimulationseffekte von Glukose und EA auf die Insulinfreisetzung (Abb. 8). Der vorübergehenden Sekretionssteigerung folgte eine rasche Hemmung der Sekretion bis auf Basalwerte, die trotz weiterer Glukose-Stimulation auch nach Eliminierung von EA anhielt.

Die konzentrationsabhängige Hemmung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion durch EA und die monophasische Hormonfreisetzung durch EA ohne und während einer Glukoseperfusion ließen vermuten, daß EA möglicherweise einen direkten Einfluß auf eine bisher hypothetische Glukose-Erkennungsstelle in oder an der Beta-Zelle ("Glukoserezeptor") ausübt. Um die Möglichkeit einer spezifischen Diskriminierungsfunktion von EA für verschiedene Insulinstimulatoren zu testen, wurde die essentielle Aminosäure Leucin verwendet. Leucin erschien deshalb eine geeignete Testsubstanz, da in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß auch Leucin in vergleichbaren Konzentrationen wie Glukose ein biphasisches Sekretionsmuster hervorrief (66, 80). Darüber hinaus scheinen Leucin und Glukose die Insulinsekretion durch unterschiedliche Wirkungsmechanismen zu stimulieren (66, 81).

EA (0,6 mM) hat die gleiche biphasische Wirkung auf die Leucin-provozierte wie auf die bereits beschriebene Glukose-induzierte Insulinsekretion. Einer kurzen Initialphase der Sekretion, die als additiver Effekt von EA und Leucin gedeutet werden muß, folgte eine starke und irreversible Hemmung der Leucin-induzierten Insulinfreisetzung (Abb. 9).

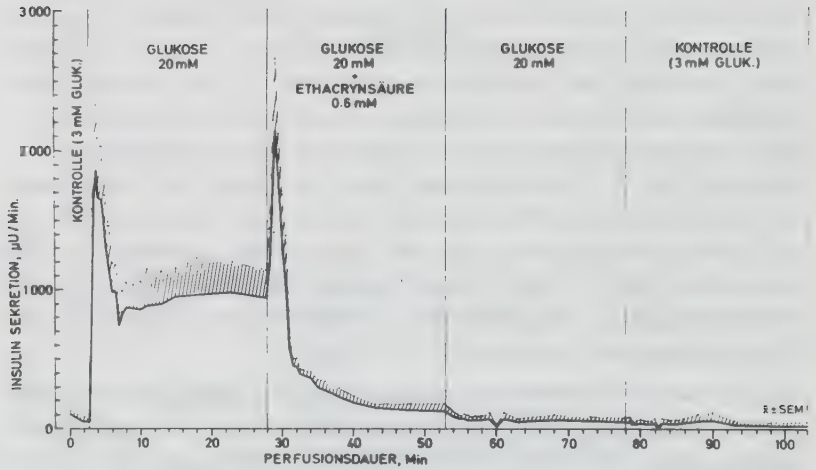


Abb. 8: Wirkung von Ethacrynsäure auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion.
Darstellung der Mittelwertskurve ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) aus 3 Experimenten.

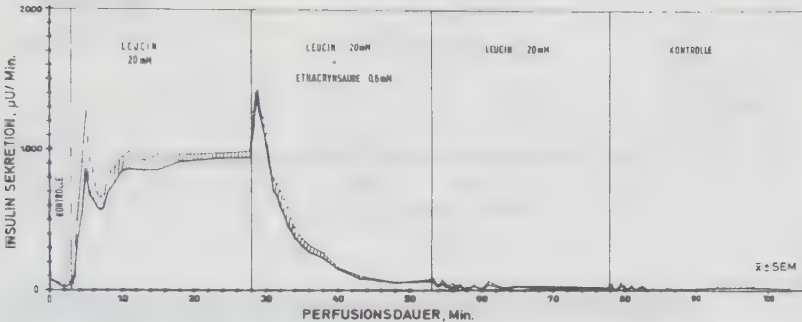


Abb. 9: Wirkung von Ethacrynsäure auf die Leucin-induzierte Insulinsekretion.
Darstellung der Mittelwertskurve ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)
aus 3 Experimenten.

3.3. Effekt von Dithiothreitol (DTT) auf die Insulinsekretion

DTT, Cleland Reagens, ist eine Substanz, die auf Grund des sehr niedrigen Redospotentials ($-0,33 \text{ V}$ bei $\text{pH } 7,0$) (77) in der Lage ist, Monothiole im reduzierten Zustand zu halten und Disulfide wirksam zu reduzieren. Seine SH-protective Wirkung ist wesentlich stärker als die der herkömmlichen Substanzen Cystein, Glutathion und Mercaptoäthanol (82, 84). Es war daher interessant, zu untersuchen, ob und in welcher Weise die Effekte von EA auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion durch DTT beeinflusst werden können. Zunächst mußte allerdings der Eigeneffekt von DTT und seine Wirkung auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion getestet werden.

Wie Abbildung 10 zeigt, führt DTT in der Konzentration von

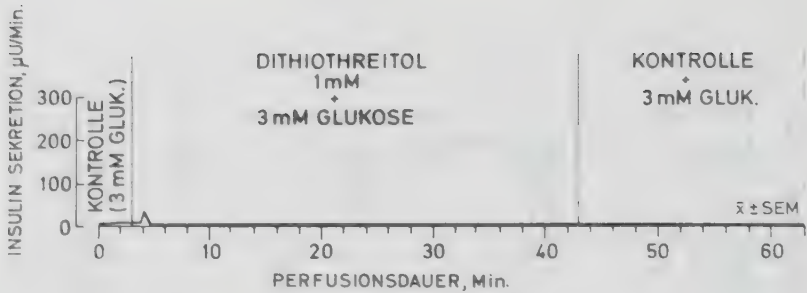


Abb. 10: Wirkung von Dithiothreitol auf die Insulinsekretion.
Glukose war in einer substimulatorischen Konzentration von 3 mMol im Perfusionsmedium vorhanden.
Dargestellt ist die Mittelwertskurve ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) aus 2 Experimenten.

1,0 mM zu keiner nennenswerten Insulinsekretion. In Anlehnung an die Experimente mit EA wurden keine Versuche mit kleineren Konzentrationen von DTT gemacht, nachdem bei einer so hohen Konzentration keine Hormonfreisetzung erfolgte.

3.4. Effekt von Dithiothreitol auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion

Diese Versuche wurden analog zu Sequenzexperimenten mit Glukose und EA durchgeführt.

In einer Konzentration von 0,1 mM verursachte DTT keinerlei Änderung der Glukose-induzierten Insulinsekretion (Abb. 11). Bei einer Konzentration von 1,0 mM führte DTT dagegen zu einer starken, jedoch nur vorübergehenden Inhibierung der Hormonsekretion, die noch während der DTT-Perfusion reversibel war. Bei der Elimination von DTT war keine zusätzliche Deinhibierung der Insulinfreisetzung festzustellen. In der nachfolgenden Glukosestimulationsphase lagen die Insulinwerte etwas unterhalb der vor der DTT-Perfusion erreichten Höhe.

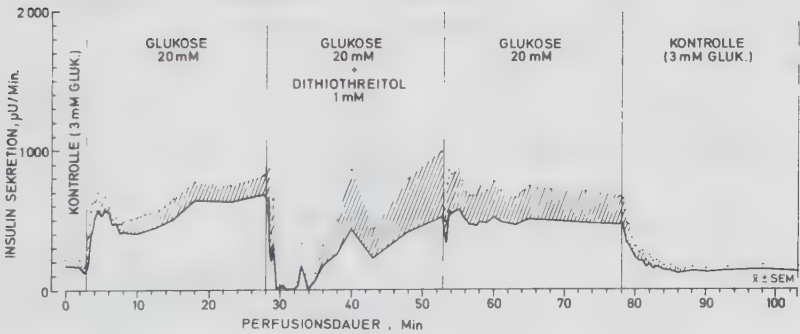
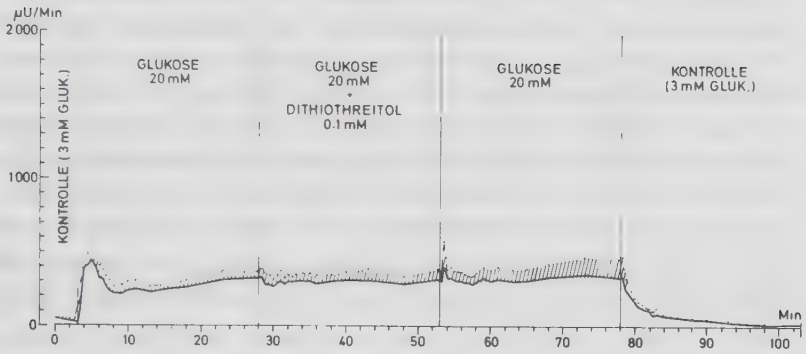


Abb. 11: Wirkung von Dithiothreitol auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion.
Dargestellt sind die Mittelwertskurven ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) aus jeweils drei Experimenten.

3.5. Zusammenwirken von Dithiothreitol und Ethacrynsäure auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion

Zur Klärung der Frage, ob der Hemmeffekt von EA auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion, der wahrscheinlich durch die Bindung von EA an SH-Gruppen verursacht wird, durch das reduzierende Agens DTT aufgehoben werden kann, wurden folgende Sequenzexperimente durchgeführt: Nach der Kontrollphase wurde 25 Minuten lang mit 20 mM Glukose, danach 25 Minuten zusätzlich mit 0,12 mM EA perfundiert. Anschließend erfolgte nach Weglassen von EA eine Perfusion mit 20 mM Glukose und 1,0 mM DTT (Abb. 12). EA verursachte erwartungsgemäß eine zunehmende Hemmung der Glukose-induzierten Insulinsekretion. Eliminierung

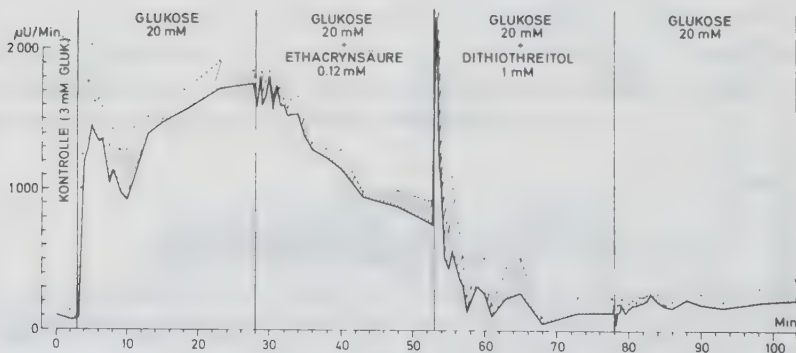


Abb. 12: Zusammenwirken von Ethacrynsäure und Dithiothreitol auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion.
Abszisse: Perfusionsdauer in Minuten
Ordinate: Insulinsekretion in uU/Min .
Dargestellt sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von drei Experimenten. Von Minute 53 plus 15 Sek. bis Minute 78 wurden die Insulinkonzentrationen im Perfusat von entsprechenden DTT enthaltenden Standardkurven abgelesen (siehe Abb. 3).

von EA und Perfusion von DTT bei fortlaufender Glukose-stimulation führte zu einer kurzen, aber sehr hohen Insulinausschüttung, der eine starke Hemmung der Sekretion folgte. Bei der anschließenden Perfusion mit Glukose ohne DTT und EA konnte die durch die beiden Substanzen erzeugte Hemmung nicht mehr aufgehoben werden. DTT verstärkt demnach den Hemmeffekt von EA, führt jedoch vor der zusätzlichen Hemmung zu einer passageren, sehr ausgeprägten Insulinausschüttung, die weder von der Entfernung von EA allein noch von DTT allein verursacht wurde (vgl. Abb. 7 und Abb. 11).

Wurde nach einer Glukosestimulation (20 mM) mit Glukose plus EA (0,12 mM) und DTT (1,0 mM) perfundiert, so zeigte sich eine kurze zusätzliche Insulinfreisetzung, gefolgt von einer totalen Hemmung der Hormonausschüttung. Diese Inhibierung war jedoch nach wenigen Minuten reversibel und die Insulinfreisetzung erreichte vor Eliminierung von EA und DTT wieder die Sekretionsraten wie mit Glukose allein (Abb. 13).

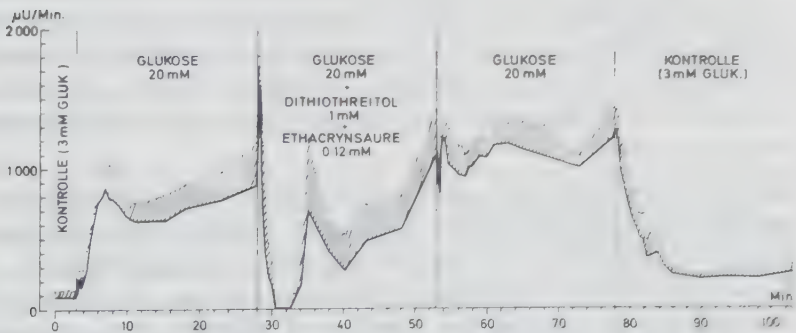


Abb. 13: Beeinflussung der Glukose-induzierten Insulinsekretion durch gleichzeitige Perfusion von EA und DTT. Darstellung der Mittelwertskurve ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von drei Experimenten. Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 12.

4.

DISKUSSION

Interpretation der Ergebnisse
mit Ethacrynsäure

Ethacrynsäure bildet mit Sulfhydrylgruppen stabile Alkylverbindungen, die auch mit Substanzen wie Cystein, Gluthathion und Mercaptoäthanol nicht reduziert werden können (65, 82). Bei Versuchen von NEEDLEMAN und JAKSCHIK an glatter Muskulatur von Kaninchen senkte Ethacrynsäure konzentrationsabhängig den Gehalt an SH-Gruppen (64, 65).

THOMAS et al. (85) postulierte, daß für die Bindung von Glukose an Zellmembranen intakte Sulfhydrylgruppen erforderlich sind. Auf der Suche nach einer möglichen Glukoseerkennungsstelle an der Insulin-sezernierenden Beta-Zelle (18) waren dabei Versuche mit SH-reaktiven Substanzen naheliegend.

Bei den Versuchen über den Eigeneffekt stellte sich Ethacrynsäure überraschenderweise selbst als Stimulator der Insulinsekretion heraus. Ein vergleichbares Ergebnis lieferten Experimente von HELLMAN et al. (59, 62) mit Jodacetat, das SH-Gruppen ebenfalls alkyliert, und mit Chloromercuri-benzene-p-sulphon-säure (CMBS), das mit SH-Gruppen Merkapptide bildet. Analog konnte mit SH-Reagentien auch die Sekretion von Wachstumshormon stimuliert werden (86).

Die der monophasischen Insulinfreisetzung zugrundeliegenden Mechanismen sind weitgehend unbekannt. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einer Verstärkung der Inselzellmembran-Permeabilität für monovalente Kationen, wie das für organische Quecksilberverbindungen von SEHLIN und TÄLJEDAL (87) beobachtet wurde. Da das Transportsystem für Natrium eng mit dem von Calcium gekoppelt zu sein scheint (13), da ferner Calcium für die Hormonsekretion unbedingt erforderlich ist (24, 25), und da drittens eine Na^+/K^+ -abhängige ATPase in Inselzellen existiert (88), scheint die durch EA hervorgerufene Sekretion mit einer Änderung des Ionenfluxes speziell von Calciumionen

verknüpft zu sein. Befunde von KABACK (89), wonach EA eine Inhibition von ATPasen in bestimmten Geweben hervorruft, und analoge Ergebnisse von DUGGAN und NOLE (90) mit Herzglykosiden stützen diese Hypothese.

Ein weiterer Hinweis dafür, daß Ethacrynsäure zu einer Stimulation der Insulinsekretion primär über eine Änderung des Ionenfluxes führt, sind Untersuchungen von SEHLIN und TÄLJEDAL über die Blockierung von ATPasen mit SH-Gruppen-aktiven Substanzen (91). DEAN und MATTHEWS (39), PACE et al. (40) und ATWATER und MEISSNER (92) konnten zeigen, daß rhythmische Polarisationen an stimulierten Inselzellen mit Änderungen des transmembranalen Ionenfluxes korrelieren. Der Beweis der Verknüpfung von Insulinsekretion, Änderung des Ionenfluxes und des Membranpotentials an der Beta-Zellmembran steht für SH-Gruppen-aktive Substanzen wie EA jedoch noch aus.

Unabhängig von der möglichen Blockierung spezifischer Ionentransportsysteme wird Ethacrynsäure wahrscheinlich ganz unspezifisch mit den in der Plasmamembran wie mit allen Biomembranen lokalisierten Sulfhydrylgruppen reagieren (59, 62, 93). Dabei scheint die Beta-Zellmembran wie die Plasmamembran der Erythrozyten über eine sehr große Anzahl von SH-Gruppen zu verfügen, was auch die spezifische Affinität von Alloxan zur Beta-Zellmembran erklären könnte (60, 93, 94).

Über die Reaktion mit SH-Gruppen ist eine Konformationsänderung der Inselzellmembran wahrscheinlich, die möglicherweise die Emiozytose der Insulin enthaltenden Granula unabhängig von dem veränderten Ionenmilieu fördert. Daß diese initiale monophasische Ethacrynsäure-stimulierte Insulinfreisetzung durch Stoffwechselveränderungen in der Beta-Zelle verursacht wird, ist eher unwahrscheinlich. EA ist gut wasserlöslich, über die Geschwindigkeit des Transports in die Zelle entscheidet aber die Lipidlöslichkeit einer Substanz. EA dürfte also wie auch p-CMBS (59, 61, 94) und die Disulfide DTNB und CPDS (60) nur langsam in die Beta-Zelle eindringen.

KABACK (89) macht für den Transport von Aminosäuren und Zuckern über die Zytoplasmamembran von Bakterien einen "SH-aktivierten" Carrier verantwortlich, der durch die Substanzen von pCMBS und N-äthylmaleimide gehemmt wird. Die Präsenz von substratspezifischen Transportsystemen auch in der Beta-Zellmembran z.B. für Glukose und Leucin ist möglich. Ethacrynsäure könnte durch unspezifische Reaktionen mit deren SH-Gruppen diese "Erkennungsstellen" zunächst aktivieren, dann jedoch durch die irreversible Alkylierung blockieren.

Diese Deutung stünde auch nicht im Widerspruch zur Addition der Stimulationseffekte bei gleichzeitiger Perfusion von Ethacrynsäure mit Glukose bzw. Leucin.

Neben der Stimulation der Hormonfreisetzung führt Ethacrynsäure auch zu einer signifikanten Hemmung einer Glukose- oder Leucin-induzierten Insulinsekretion. Ähnliche Effekte wurden von HELLMAN et al. (62) für Jodacetamid und von RALPH et al. (95) für Jodacetat und Antimycin A beschrieben. Da EA in bestimmten zellfreien Präparationen (84, 96) mehrere SH-haltige Enzyme der Glykolyse und der Atmungskette hemmt, und in einigen Zellen ebenfalls wichtige Enzyme wie z.B. die GAPDH (97, 98, 99) und die Adenylzyklase (83) konzentrationsabhängig inaktiviert, wäre eine Hemmung der Insulinfreisetzung infolge wichtiger Änderungen des Inselzellstoffwechsels denkbar. Eine allmähliche dosisabhängige Penetration von Ethacrynsäure mit nachfolgender Inhibierung der erwähnten Enzyme könnte die beobachtete konzentrationsabhängige und zeitlich verzögerte Insulinsekretionshemmung erklären.

Die Irreversibilität des Ethacrynsäure-Hemmeffektes in dem von uns begrenzten Zeitintervall mag mit einer irreversiblen Alkylierung aktiver SH-Gruppen in der Zellmembran oder in der Zelle selbst in Zusammenhang stehen.

Da Ethacrynsäure wie oben aufgeführt durch unspezifische Bindung an SH-Gruppen viele Angriffspunkte an und in der Beta-Zelle hat, ist es wahrscheinlich, daß die Stimulation der Hormonfreisetzung

durch EA und die Hemmung der Glukose- bzw. Leucin-induzierten Insulinsekretion durch sehr komplexe Reaktionen zustande kommt. Während der Stimulationseffekt von EA durch einen "reinen Membraneffekt" zu erklären wäre, kommt die Inhibition wahrscheinlich durch ein Zusammenwirken der Vorgänge an der Beta-Zellmembran und der nachfolgenden Alteration des intrazellulären Stoffwechsels zustande.

Interpretation der Ergebnisse mit Dithiothreitol

Über die Eigeneffekte von Dithiothreitol an der Beta-Zelle gibt es in der einschlägigen Literatur keine Hinweise. Es wird jedoch wegen seines bekannt niedrigen Redoxpotentials als protektives Agens sensibler SH-Gruppen tragender Enzyme verwendet.

Obwohl ähnlich reduzierende Substanzen wie Cystein (100) und reduzierte Pyridinnukleotide (101, 102) die Insulinausschüttung aktivieren können, stimulierte DTT in unseren Experimenten die Insulinsekretion nicht. Nach der Hypothese von HELLMAN et al. (100) ist für die Stimuluserkennung und/oder die Sekretionsauslösung ein bestimmtes Thiol-Disulfid-Äquilibrium in der Zellmembran notwendig. Dieses Gleichgewicht, in welchem Gluthathion eine wesentliche Rolle zu spielen scheint (101), soll während der Insulinsekretion auf die Seite der Disulfidbindung verschoben sein. Wird diese Oxidation der Thiole durch ein stark reduzierendes Agens, wie DTT, verhindert, so müßte eine Hemmung der Insulinsekretion resultieren. Unsere Experimente mit DTT allein und in Anwesenheit von Glukose stützen diese Vermutung. Nicht erklärbar ist dagegen die Beobachtung, daß die durch DTT verursachte Hemmung der Glukose-induzierten Insulinsekretion noch während der Exposition der Langerhans'schen Inseln mit DTT reversibel ist. Offensichtlich sind Messungen des Redoxstatus und des Ionenflusses, und die Bestimmung von Schlüsselsubstraten und -enzymen in den Langerhans'schen Inseln unter diesen Bedingungen notwendig, bevor dieses Phänomen erklärt werden kann.

Interpretation der Sequenzexperimente

Dithiothreitol (DTT) kann die hemmende Wirkung von Ethacrynsäure (EA) oder Dithiobisnitrobenzoylsäure (DTNB) auf die Gehirnnadenylzyklase verhindern, wenn es vorher oder gleichzeitig mit EA oder DTNB dem Inkubationsmedium zugegeben wird (83). DTT kann ebenfalls die Hemmung der Glykolyse durch EA in Hämolysaten wirksam verhindern (84). Wie JAKSCHIK et al. (82) zeigen konnten, bleibt auch die Blockierung von GAPDH und Monoaminoxidase durch EA in den Mitochondrien bestimmter Zellen bei Präinkubation mit DTT aus. HELLMAN et al. (62) registrierten bei Inkubation mit DTT initial eine leicht vermehrte, in der Folge aber stark verminderte Aufnahme von Jodacetamid, einer anderen SH-reaktiven Substanz, in die Beta-Zelle. In verschiedenen experimentellen Ansätzen findet sich demnach ein Antagonismus von DTT und SH-reaktiven Substanzen.

Auch in unserem experimentellen Modell hat DTT einen protektiven Effekt gegenüber Ethacrynsäure. Die durch EA hervorgerufene Inhibierung der Glukose-induzierten Insulinsekretion kann durch gleichzeitige Perfusion mit DTT verhindert werden. Die Hemmung der durch Glukose induzierten Insulinfreisetzung durch EA ist jedoch nicht aufhebbar, wenn die EA-Perfusion der DTT-Exposition vorgeschaltet ist. Die durch EA alkylierten Sulfhydrylgruppen der Beta-Zellen scheinen unter diesen Bedingungen irreversibel blockiert.

Interessant ist die kurze aber signifikante Insulinsekretion nach Elimination von EA und Perfusion mit DTT (Abb. 12) oder bei gleichzeitiger Perfusion von EA und DTT (Abb. 13). Der "off-Effekt" (67) bei Elimination von EA ist als Deinhibierung der Insulinfreisetzung nach EA-Entfernung zu interpretieren, die jedoch nur in Anwesenheit eines reduzierenden Agens wie DTT zu sehen ist. Die initiale Insulinsekretion bei kombinierter Stimulation mit EA und DTT steht wahrscheinlich mit der plötzlichen Änderung des Redoxpotentials an der Beta-Zellmembran durch die DTT-bedingte Reduktion oxydierter Sulfhydrylgruppen und mit der durch EA induzierten Änderung des Ionenfluxes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) in Verbindung.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Experimente von NEEDLEMAN et al., HELLMAN et al. und KABACK zeigten die wichtige Rolle auf, die Sulfhydrylgruppen an Biomembranen spielen. Um die Bedeutung solcher membran-gebundener SH-Gruppen an der Beta-Zellmembran für die Stimuluserkennung und Sekretionsauslösung zu erforschen, wurden am perfundierten Rattenpankreas Versuche mit den SH-reaktiven Substanzen Ethacrynsäure (EA) und Dithiothreitol (DTT) durchgeführt. Dabei verursachte EA (0,075 - 0,6 mM) konzentrationsabhängig eine initiale monophasische Insulinsekretion. DTT (1,0 mM) in Anwesenheit von 3 mM Glukose führte zu keiner Insulinfreisetzung. Die Versuche von EA (0,075 - 0,6 mM) und Glukose (20 mM) ergaben eine dosisabhängige Addition der Stimulationseffekte beider Substanzen, der eine konzentrationsabhängige Hemmung der Glukose-induzierten Insulinfreisetzung folgte. Die Hemmung war auch nach der Eliminierung von EA irreversibel. Zur Klärung der Selektivität des EA-Effektes wurden Versuche mit Leucin (20 mM) und EA (0,6 mM) durchgeführt. Auch die Leucin-stimulierte Hormonfreisetzung wird durch EA irreversibel gehemmt.

Im Gegensatz dazu führte Dithiothreitol nur zu einer passageren Hemmung der Glukose-induzierten Insulinsekretion.

Bei gleichzeitiger Perfusion von EA und Glukose vermochte DTT die irreversible EA-bedingte Hemmung der Glukose-induzierten Insulinsekretion teilweise zu verhindern. Eine bereits erfolgte Inhibition durch EA konnte auch nach deren Eliminierung in einer nachfolgenden Perfusion mit DTT nicht aufgehoben werden.

Diese Befunde in Verbindung mit den Daten aus der Literatur stützen die These, daß membran-gebundene Sulfhydrylgruppen in Bezug auf die Stimuluserkennung und den Insulinsekretionsprozeß der Beta-Zelle eine Schlüsselstellung einnehmen.

SUMMARY

Studies of NEEDLEMAN et al., HELLMAN et al. and KABACK suggested that sulfhydryl groups of biomembranes play an important role in cellular function. In order to proof the importance of such SH-groups bound to the beta cell membrane for the stimulus-recognition and the mechanism of hormonal discharge, perfusions of the rat pancreas were undertaken with the sulfhydryl-reactive agents ethacrynic acid (EA) and dithiothreitol (DTT).

In these studies EA (0.075 - 0.6 mM) produced a dose-dependent monophasic insulin release. DTT (1.0 mM) in the presence of 3 mM glucose had no secretory effect. Perfusions of EA (0.075 - 0.6 mM) and glucose (20 mM) caused a dose-dependent addition of the stimulatory effect of both agents, followed subsequently by a concentration-dependent inhibition of the glucose-induced insulin secretion. This inhibition was not reversible even after elimination of EA.

Experiments with leucine (20 mM) and EA (0.6 mM) were performed to proof the selectivity of the EA-effect. EA had the same inhibitory effect on the leucine-stimulated hormone release. DTT, however, produced only a transitory inhibition of the glucose-induced insulin secretion.

When EA, DTT, and glucose were perfused simultaneously, DTT could partially prevent the inhibitory effect of EA on the glucose-induced insulin release. Yet, the inhibitory effect of EA could not be reversed by a subsequent perfusion with DTT and omission of EA.

These findings in connection with data from other studies suggest that membrane-bound sulfhydryl groups obviously play a deciding role in the stimulus-recognition- and insulin release mechanism of the beta cell.

6. LITERATUR

1. MEHRING, J., O.MINKOWSKI:
Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation.
Arch.Exptl.Pathol.Pharmakol. 26 : 371 (1889)
2. LANGERHANS, P.:
Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der
Bauchspeicheldrüse.
Dissertation - Berlin 1869
3. LAGUESSE, E.L.:
Sur la formation des îlots de Langerhans dans
le pancreas.
Compt.Rend.Soc.Biol. 5 : 819 (1893)
4. BANTING, R.G., and C.H.BEST:
Internal secretion of pancreas.
J.Lab.Clin.Med. 7 : 251 (1922)
5. DUNN, SHEEHAN, McLEITCHIE:
Experimental alloxan diabetes in rat.
Lancet II : 382 (1943)
6. GRODSKY, G.M., A.A.BATTS, L.L.BENNETT, C.VALLA,
N.B.McWILLIAMS, and D.F.SMITH:
Effects of carbohydrates on secretion of
insulin from isolated rat pancreas.
Am.J.Physiol. 205 : 638 (1963)
7. COORE, H.G., P.J.RANDLE, E.SIMON, P.F.KRAICER,
M.C.SHELESNYAK:
Block of insulin secretion by D-mannoheptulose.
Nature 197 : 1264 (1963)
8. COORE, H.G., P.J.RANDLE:
Inhibition of glucose phosphorylation by
mannoheptulose.
Biochem.J. 91 : 56 (1964)
9. ASHCROFT, S.J.H., and P.J.RANDLE:
Glucose phosphorylation and glucose oxidation
in the beta cell of the pancreas.
In: Structure and metabolism of the pancreatic
islets, edited by S.Falkmer, B.Hellman, and
I.-B.Täljedal.
Pergamon Press, Oxford 1970, p. 225.

10. ASHCROFT, S.J.H., C.J.HEDESKOW, and P.J.RANDLE:
Glucose metabolism in pancreatic islets.
Biochem.J. 118 : 143 (1970)
11. MATSCHINSKY, F.M., and J.E.ELLERMAN:
Metabolism of glucose in the islets of
Langerhans.
J.Biol.Chem. 243 : 2730 (1968)
12. IDAHL, L.A.:
Dynamics of pancreatic beta-cell response
to glucose.
Diabetologia 9 : 403 (1973)
13. MALAISSE, W.J., A.HERCHNELZ, J.LEVY, G.SOMERS, G.DEVIS,
M.RAVAZZOLA, F.MALAISSÉ-LAGAE, L.ORCI:
Insulin release and the movement of calcium
in pancreatic islets.
In: Calcium-transport in contraction and
secretion.
E. Carafoli (ed.), North-Holland Publishing
Company 1975, p.211.
14. LANDGRAF, R., J.KOTLER-BRAJTURG, and F.M.MATSCHINSKY:
Kinetics of insulin release from the
perfused rat pancreas caused by glucose,
glucosamine and galactose.
Proc.Nat.Acad.Sci., US., 68 : 536 (1971)
15. LÖFFLER, G., P.PETRIDES, and P.THEISS:
Zur Stimulierung der Insulinsekretion durch
Glukose.
7. Kongreß der Deutschen Diabetes Gesellschaft,
Bad Nauheim, 1972.
Novo Dokumentation, Kopenhagen.
16. ASHCROFT, S.J.H., L.C.C.WEERASINGHE, P.J.RANDLE:
Interrelationship of islet metabolism,
adenosine triphosphat content and insulin
release.
Biochem.J. 132 : 223 (1973)
17. MATSCHINSKY, F.M., J.E.ELLERMAN, J.KRZANOWSKI,
J.KOTLER-BRAJTURG, R.LANDGRAF, R.FERTEL:
The dual function of glucose in islets of
Langerhans.
J.Biol.Chem. 246 : 1007 (1971)
18. MATSCHINSKY, F.M., R.LANDGRAF, J.ELLERMAN, J.KOTLER-
BRAJTURG:
Glucoreceptor mechanisms in islets of Langerhans.
Diabetes 21, Suppl. 2 : 555 (1972)

19. PACE, C.S., J.ELLERMAN, B.HOVER, S.N.STILLINGS,
F.M.MATSCHINSKY:
Multiple metabolic functions of glucose in
rat pancreas islets.
Diabetes 24 : 476 (1975)
20. MAIER, V., M.HINZ, H.SCHATZ, C.NIERLE, and E.F.PFEIFFER:
Evidence for a specific glucoreceptor by
removal of sialic acid from isolated
pancreatic islets of mice.
Diabetologia 9 : 80 (1973)
21. GRODSKY, G.M., L.L.BENNETT:
Cation requirement for insulin secretion in
the isolated perfused pancreas.
Diabetes 15 : 910 (1966)
22. MILNER, R.D.G., and C.N.HALES:
The sodium pump and insulin secretion.
Biochim.Biophys.Acta 135 : 375 (1967)
23. MILNER, R.D.G., and C.N.HALES:
The stimulation by potassium of insulin
secretion from rabbit pancreas in vitro.
Biochem.J. 105 : 28 (1967)
24. LAMBERT, A.E., B.JEANRENAUD, A.JUNOD, and A.E.RENOLD:
Organ culture of fetal rat pancreas:
II. Insulin release induced by amino acids
and organic acids, by hormonal peptides,
by cationic alterations of the medium and by
other agents.
Biochim.Biophys.Acta 184 : 540 (1969)
25. JUNOD, A., J.LETARTE, A.E.LAMBERT, and W.STAUFFACHER:
Studies in spiny mice: metabolic state and
pancreatic insulin release in vitro.
Horm.Metab.Res. 1 : 45 (1969)
26. MILNER, R.D.G., and C.N.HALES:
The role of calcium and magnesium in insulin
secretion from rabbit pancreas studied in
vitro.
Diabetologia 3 : 47 (1967)
27. CURRY, D.L., L.L.BENNETT, and G.M.GRODSKY:
Requirement for calcium-ions in insulin
secretion by the perfused rat pancreas.
Am.J.Physiol. 214 : 174 (1968)
28. MALAISSE-LAGAE, F., W.J.MALAISSE:
Glucose stimulated uptake of calcium-isotops
by isolated islets of Langerhans.
Endocrinology 88 : 72 (1971)

29. HELLMAN, B., J.O.SEHLIN, I.-B.TÄLJEDAL:
Calcium-entry by glucose stimulation.
Am.J.Physiol. 221 : 1795 (1971)
30. WOLLHEIM, C.B., B.BLONDEL, P.A.TRUEHEART, A.E.RENOLD,
and G.W.G.SHARP:
Calcium-induced insulin release in monolayer
cultures of the endocrine pancreas.
J.Biol.Chem. 250 : 1354 (1975)
31. MALAISSE, W.J., D.G.PIPERLEERS:
The role of cations in insulin synthesis and
release.
Excerpta Medica Int.Congr.Ser. No.312,
p. 95 (1974)
32. MALAISSE, W.J., G.R.BRISSON, L.E.BAIRD:
Stimulus-secretion coupling of glucose-
induced insulin release. X. Effects of
glucose on ⁴⁵calcium-efflux from perfused
islets.
Am.J.Physiol. 224 : 389 (1973)
33. MALAISSE, W.J., F.MALAISSÉ-LAGAE, M.O.WALKER, P.E.LACY:
The stimulus-secretion coupling of glucose-
induced insulin release. (The participation
of a microtubular-microfilamentous system).
Diabetes 20 : 257 (1971)
34. SOMERS, G., E.van OBBERGHEN, G.DEVIS, M.RAVAZZOLA,
F.MALAISSÉ-LAGAE, W.F.MALAISSÉ:
Dynamics of insulin release and the micro-
tubular-microfilamentous system. (Effects of
colchicine upon glucose-induced insulin
secretion).
Europ.J.Clin.Invest. 4 : 299 (1974)
35. MALAISSE, W.J., E.van OBBERGHEN, G.DEVIS, G.SOMERS, and
M.RAVAZZOLA:
Dynamics of insulin release and microtubular-
microfilamentous system. (A model for the
phasic release of insulin).
Europ.J.Clin.Invest. 4 : 313 (1974)
36. RENOLD, A.E.:
Insulin biosynthesis and secretion - a still
unsettled topic.
The New England Journal of Medicine 282 :
173 (1970)
37. MATTHEWS, E.K., and P.M.DEAN:
Electrical activity in islet cells.
In: The structure and metabolism of the pancreatic
islets, edited by S. Falkmer, B. Hellman and
I.-B. Täljedal, Oxford, Pergamon Press, 1970, p.30

38. MATTHEWS, E.K., and Y.SAKAMOTO:
Pancreatic islet cells: Electrogenic and
electrodiffusional control of membrane
potential.
J.of Physiol. 246 : 439 (1975)
39. DEAN, P.M., E.K.MATTHEWS, and Y.SAKAMOTO:
Pancreatic islet cells: Effects of mono-
saccharides, glycolytic intermediates and
metabolic inhibitors on the membrane potential
and electrical activity.
J.of Physiol. 246 : 459 (1975)
40. PACE, C.S., S.N.STILLINGS, B.A.HOVER, F.M.MATSCHINSKY:
Electrical and secretory manifestations of
glucose and amino acid interactions in rat
pancreatic islets.
Diabetes 24 : 489 (1975)
41. MALAISSE, W.J., F.MALAISSE-LAGAE, and D.MAYBEW:
A possible role for the adenylcyclase system
in insulin secretion.
J.Clin.Invest. 46 : 1724 (1967)
42. SAMS, D.J., W.MONTAGUE:
The role of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphat
in the regulation of insulin release.
Biochem.J. 129 : 945 (1972)
43. SUSSMAN, K.E., G.D.VAUGHAN:
Insulin release after ACTH, glucagon and
cyclic AMP (adenosine-3'-5'-phosphat) in
the perfused isolated rat pancreas.
Diabetes 16 : 449 (1967)
44. GOLDFINE, J.D., R.PELMANN, J.ROTH:
Inhibition of cyclic 3'-5'-AMP-phosphodiesterase
in islet cells and other tissues by tolbutamide.
Nature 234 : 295 (1971)
45. BASABE, J.C., N.L.LOPEZ, J.K.VIKTORIA, F.W.WOLFF:
Insulin secretion studied in the perfused rat
pancreas (II. Effect of glucose, glucagon,
3',5'-adenosine monophosphate, theophylline,
imidazole and phenoxybenzamine.
Diabetes 20 : 457 (1971)
46. WU-NAN KUO, D.S.HODGLEINS, J.F.KUO:
Adenylate cyclase in islets of Langerhans.
J.of Biol.Chem. 248 : 2705 (1973)

47. TURTLE, J.R., G.K.LITTLETON, D.M.KIPNIS:
 Stimulation of insulin secretion by
 theophyllin.
 Nature 213 : 727 (1967)
48. BOWEN, V., N.R.LAZARUS:
 Glucose-mediated insulin release:
 3'-5'-AMP-phosphodiesterase.
 Diabetes 22 : 738 (1973)
49. SODOYEZ, J.C., F.SODOYEZ-GOFFAUX, and P.P.FOA:
 Feedback regulation of insulin release
 by insulin itself: role of 3'-5'-cyclic
 AMP.
 In: Structure and metabolism of the
 pancreatic islets, edited by S. Falkmer,
 B. Hellman and I.-B. Täljedal.
 Pergamon Press, Oxford 1970, p. 445.
50. ZAWALICH, W.S., R.C.KARL, J.A.FERRENDELLI, and
 F.M.MATSCHINSKY:
 Factors governing glucose induced elevation
 of cyclic 3'-5'-AMP levels in pancreatic
 islets.
 Diabetologia 11 : 231 (1975)
51. ORCI, L., M.RAVAZZOLA, M.AMHERDT, F.MALAISSÉ-LAGAE:
 The beta-cell boundary.
 In: Diabetes, Proc.8th Congr.Int.Diab.
 Fed., Brussels (1973)
 Edited by W.J.Malaisse, J.Pirart, Int.Congr.
 Ser. No. 312.
52. ORCI, L., M.AMHERDT, J.C.HENGUIN, A.E.LAMBERT,
 R.H. UNGER, A.E.RENOLD:
 Pronase effect on pancreatic beta-cell
 secretion and morphology.
 Science 180 : 647 (1973)
53. LAMBERT, A.E., J.C.HENGUIN, L.ORCI:
 Role of beta-cell membrane in insulin secretion.
 Proc. 8th Congr.Int.Diab.Fed., Excerpta
 medica Int.Congr.Series No.312, p.79 (1974)
54. MAIER, V., M.HINZ, H.SCHATZ, C.NIERLE, E.F.PFEIFFER:
 Evidence for a specific glucose receptor by
 removal of sialic acid from isolated pancreatic
 islets of mice.
 Diabetologia 9 : 80 (1973)
55. TÄLJEDAL, I.-B., and H.J.HAHN:
 Neuraminidase treatment of pancreatic islets;
 effects on sialic acid, c-AMP and release of
 insulin.
 Diabetologia 10 : 388 (1974)

56. LUNDQUIST, J.:
Significance of acid amyloglucosidase in
sulphonylureas-induced insulin release.
Diabetologia 10 : 717 (1974)
57. MAIER, V., J.J.GAGLIARDINO, M.HINZ, H.SCHATZ, E.F.PFEIFFER:
Treatment of pancreatic islets of mice
by alpha-neuraminidase and the phospholipases
C + D.
VIII. Congr.Int.Diab.Fed., Excerpta medica
Congr.Ser.No.280, p.25 (1973)
58. EWART, R.B.L., D.M.KIPNIS:
Effects of lectins on hormone release from
isolated rat islets of Langerhans.
Diabetes 24 : 705 (1975)
59. HELLMAN, B., A.LERNMARK, J.SEHLIN, M.SÖDERBERG,
I.-B.TÅLJEDAL:
The pancreatic beta-cell recognition of
insulin secretagogues. VII. Binding and
permeation of chloromercuribenzene-p-sulphonic
acid in the plasma membrane of pancreatic
beta-cells.
Arch.Biochem.Biophys. 158 : 435 (1973)
60. HELLMAN, B., L.A.IDAHL, A.LERNMARK, J.SEHLIN, I.-B.TÅLJEDAL:
Role of membrane thiol groups in insulin
release: Studies with poorly permeating
disulphides.
Mol.Pharmacol. 9 : 792 (1973)
61. HELLMAN, B., L.A.IDAHL, A.LERNMARK, J.SEHLIN, I.-B.TÅLJEDAL:
Membrane sulphydrylgroups and the pancreatic
beta-cell recognition of insulin secretagogues.
Proc. 8th Congr.Int.Diab.Fed., Excerpta medica
Int.Congr.Series, No. 312, p.65 (1974)
62. HELLMAN, B., L.A.IDAHL, A.LERNMARK, J.SEHLIN, I.-B.TÅLJEDAL:
Iodoacetamide-induced sensitization of the
pancreatic beta-cells to glucose stimulation.
Biochem.J. 132 : 775 (1973)
63. HELLMAN, B., L.A.IDAHL, A.LERNMARK, J.SEHLIN, I.-B.TÅLJEDAL:
Stimulation and inhibition of insulin release by
an amino-reactive probe of plasma membrane.
J.Membr.Biol. 14 : 135 (1973)
64. NEEDLEMAN, P., and J.M.JOHNSON jr.:
Mechanisms of tolerance development to organic
nitrites.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 184 : 709 (1973)

65. NEEDLEMAN, P., B.JAKSCHIK, E.M.JOHNSON jr.:
Sulfhydryl requirement for relaxation of
vascular smooth muscle.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 187 : 324 (1973)
66. LANDGRAF, R., M.M.C.LANDGRAF-LEURS, R.HÖRL:
L-leucine and L-phenyl-alanine induced insulin
release and the influence of D-glucose kinetic
studies with the perfused rat pancreas.
Diabetologia 10 : 415 (1974)
67. LANDGRAF-LEURS, M.M.C., R.LANDGRAF, R.DAFFNER, R.HÖRL:
The stimulatory and inhibitory function of
theophylline on amino acid induced insulin
release.
Endocrinology 97 : 1416 (1975)
68. LERNMARK, A.:
Specifity of leucine stimulation of insulin
release.
Hormones 3 : 14 (1972)
69. GRODSKY, G.M., A.A.BATTS, L.L.BENNETT, C.VCELLA,
N.B.McWILLIAMS, and D.F.SMITH:
Effects of carbohydrates on secretion of
insulin from isolated rat pancreas.
Am.J.Physiol. 205 : 638 (1963)
70. SUSSMAN, K.E., G.D.VAUGHAN, and R.F.TIMMER:
An in vitro method for studying insulin
secretion in the perfused isolated rat
pancreas.
Diabetes 15 : 521 (1966)
71. CURRY, D.L., K.P.CURRY:
Hypothermia and insulin secretion.
Endocrinology 87 : 750 (1970)
72. KRZANOWSKI, J.J., jr., R.FERTEL, F.M.MATSCHINSKY:
Energy metabolism in pancreatic islets of
rats. Studies with tolbutamide and hypoxia.
Diabetes 20 : 598 (1971)
73. IDAHL, L.A.:
Dynamics of pancreatic beta-cell responses
to glucose.
Diabetologia 9 : 403 (1973)
74. HALES, C.N., and P.J.RANDLE:
Immunoassay of insulin with insulin-antibody
precipitate.
Biochem.J. 88 : 137 (1963)

75. BOTTERMANN, P., R.ERMLER, and J.HENNER:
A semiautomatic method for immunoassay
for insulin and hGH.
Horm.Metab.Res. 3 : 55 (1971)
76. MARSCHNER, I., F.ERHARDT, P.C.SCRIBA:
Calculation of the radioimmunoassay standard
curve by "spline function".
International Atomic Energy Agency,
Vol. 1 : 111 (1974)
77. CLELAND, W.W.:
Dithiothreitol, a new protective reagent for
SH-groups.
Biochemistry 3 : 480 (1964)
78. MERCK, SHARPE und DOHME, Pharmazeutische Firma, München:
Aus einer Zusammenfassung der klinischen und
pharmakologischen Untersuchungen.
79. CURRY, D.L., L.L.BENNETT, G.M.GRODSKY:
Dynamics of insulin secretion by the perfused
rat pancreas.
Endocrinology 83 : 572 (1968)
80. BASABE, J.C., N.L.LOPEZ, J.K.VIKTORIA, F.W.WOLFF:
Insulin secretion studied in the perfused rat
pancreas. I. Effect of tolbutamid, leucine
and arginine, their interactions with
diazoxide, and relation to glucose.
Diabetes 20 : 449 (1971)
81. HELLMAN, B., J.SEHLIN, I.-B.TÄLJEDAL:
Uptake of alanine, arginine and leucine by
mammalian pancreatic beta-cells.
Endocrinology 89 : 1432 (1971)
82. JAKSCHIK, B., and P.NEEDLEMAN:
Sulfhydryl reactivity of organic nitrates:
Biochemical basis for inhibition of
glyceraldehyde-p-dehydrogenase and mono-
amine oxidase.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 53 : 539 (1973)
83. FERRENDELLI, J.A., E.M.JOHNSON, M.M.CHONG, P.NEEDLEMAN:
Inhibition of brain adenylyclase by
ethacrynic acid and dithiobisnitrobenzoic acid.
Biochem.Pharm. 22 : 3133 (1973)

84. KLAHR, S., J.YATES, J.BOURGOIGNIE:
Inhibition of glycolysis by ethacrynic
acid and furosemid.
Am.J.of Physiol. 221 : 1036 (1971)
85. THOMAS, L., R.KINNE, and P.P.FROHNERT:
N-ethylmaleinide labeling of a phlorizine-
sensitive D-glucose binding site of brush
border membrane from rat kidney.
Biochim.Biophys.Acta 290 : 125 (1972)
86. SCHOFIELD, J.G.:
Effect of sulphhydryl reagents on the release
of ox growth hormone in vitro.
Biochim.Biophys.Acta 252 : 516 (1971)
87. SEHLIN, J., I.-B.TÅLJEDAL:
Sodium uptake by microdissected pancreatic
islets: Effect of ouabain and chloromercuri-
benzene-p-sulphonic acid.
FEBS Letters 39 : 209 (1974)
88. KEMMLER, W., G.LÖFFLER, H.MEHNERT:
Calcium ATPase activity in isolated rat islets
of Langerhans.
Diabetologia 10 : 372 (1974)
89. KABACK, H.R.:
Transport across isolated bacterial cyto-
plasmic membranes.
Biochim.Biophys.Acta 265 : 367 (1972)
90. DUGGAN, O.A., and R.M.NOLL:
Effect of cardiac glycosides upon a membrane
adenosinetriphosphatase of renal cortex.
Arch.Biochem.Biophys. 109 : 388 (1965)
91. SEHLIN, J., I.-B.TÅLJEDAL:
Transport of rubidium and sodium in pancreatic
islets.
J.Physiol. 242 : 505 (1974)
92. ATWATER, J., H.P.MEISSNER:
Electrogenic sodium pump in beta-cells of
islets of Langerhans.
J.Physiol. 247 : 56 (1975)
93. KNAUF, P.A., A.ROTHSTEIN:
Chemical modification of membranes.
I. Effects of sulphhydryl and amino reactive
reagents on anion and cation permeability of
the human red blood cell.
J.Gen.Physiol. 58 : 190 (1971)

94. KNAUF, P.A., A.ROTHSTEIN:
Chemical modification of membranes.
II. Permeation paths for sulphhydryl agents.
J.Gen.Physiol. 58 : 211 (1971)
95. RALPH, H.G., K.E.SUSSMAN, J.W.LEITNER, W.M.KIRSCH:
Inhibition of glucose and tolbutamide-
induced insulin release by jodacetate and
antimycin A.
Endocrinology 89 : 169 (1971)
96. KRAMAR, R., and E.KAISER:
Hemmung von SH-Enzymen durch EA.
Experientia 26 : 485 (1970)
97. GORDON, E.E.:
Site of ethacrynic acid-action on Ehrlich
ascites tumor cells.
Biochem.Pharmacol. 17 : 1237 (1968)
98. GORDON, E.E., and M.de HARTOG:
The relationship between cell membrane
potassium ion transport and glycolysis;
the effect of ethacrynic acid.
J.Gen.Physiol. 54 : 650 (1969)
99. JONES, V.D., and E.J.LANDON:
The effect of ouabain, meralloride and
ethacrynic acid on respiration and glycolysis
in kidney slices.
Biochem.Pharmacol. 16 : 2163 (1967)
100. HELLMAN, B.:
Regulation of insulin release by sulphhydryl
groups in beta-cell membrane.
Proc. 7th Karlsberger Konferenz,
Karlsberg 1974.
101. AMMON, HlP.T., and J.STEINKE:
6-aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic
agent. In vitro and in vivo studies in the rat.
Diabetes 21 : 143 (1972)
102. WATKINS, D., S.J.COOPERSTEIN, P.D.DIXOT, and A.LAZAROW:
Insulin secretion from toadfish islet tissue
stimulated by pyridine nucleotides.
Science 162 : 283 (1968)

Lebenslauf

Am 5.2.1947 wurde ich als drittes Kind meiner Eltern Ludwig und Emma Mayer in Sonthofen/Allgäu geboren.

Von 1953 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Sonthofen, ab 1958 das Gymnasium in Oberstdorf, wo ich 1967 die Reifeprüfung ablegte. Bis 1969 leistete ich meinen Wehr- und Zivildienst ab.

Nach fünf Semestern absolvierte ich im Herbst 1971 die ärztliche Vorprüfung an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die ersten zwei klinischen Semester studierte ich in Paris an der Medizinischen Fakultät Broussais-Hôtel Dieu. Im Juni 1975 legte ich in München das Medizinische Staatsexamen mit der Note "sehr gut" ab. Im Juli 1975 bestand ich das Examen des Educational Council for Foreign Medical Graduates.

Seit Oktober 1975 war ich als Medizinalassistent auf der Inneren Abteilung des Krankenhauses Schwabing und auf den Chirurgischen Abteilungen des Krankenhauses Oberstdorf und des Dritten Ordens in Nymphenburg tätig.

